

09/763914 EP 99/06317

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



21. Okt. 1999

ESU

REC'D 10 NOV 1999

WIPO PCT

Bescheinigung

Die Ferrarius Biotechnology GmbH in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren und Vorrichtung zur integrierten Synthese und
Analyse von Polymeren"

am 27. Mai 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht und erklärt, daß sie dafür die Inneren Prioritäten der Anmeldungen in der Bundesrepublik Deutschland vom 28. August 1998, Aktenzeichen 198 39 254.0 und vom 19. Februar 1999, Aktenzeichen 199 07 080.6, in Anspruch nimmt.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 33/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 7. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Joost

Aktenzeichen: 199 24 327.1



B s c h r i b u n g

1 Technischer Hintergrund der Erfindung

Für die Grundlagenforschung in den Biowissenschaften und für die medizinische Diagnostik sowie einige andere wissenschaftliche Disziplinen ist die Erfassung biologisch relevanter Information in definiertem Untersuchungsmaterial von herausragender Bedeutung. Zumeist steht dabei die genetische Information im Mittelpunkt des Interesses. Diese genetische Information besteht in einer enormen Vielfalt unterschiedlicher Nukleinsäuresequenzen, der DNA (desoxyribonucleic acid). Die Nutzung dieser Information im biologischen Organismus führt über die Herstellung von Abschriften der DNA in RNA (ribonucleic acid) meist zur Synthese von Proteinen, die ihrerseits häufig an biochemischen Reaktionen beteiligt sind.

Um diese Wirkprinzipien der Natur besser verstehen zu können, ist eine effiziente und sichere Entschlüsselung von DNA-Sequenzen notwendig. Die Detektion von Nukleinsäuren und die Bestimmung der Abfolge der vier Basen in der Kette der Nukleotide, die generell als Sequenzierung bezeichnet wird, liefert wertvolle Daten für Forschung und angewandte Medizin. In der Medizin konnte in stark zunehmendem Maße durch die in vitro-Diagnostik (IVD) ein Instrumentarium zur Bestimmung wichtiger Patientenparameter entwickelt und dem behandelnden Arzt zur Verfügung gestellt werden. Für viele Erkrankungen wäre eine Diagnose zu einem ausreichend frühen Zeitpunkt ohne dieses Instrumentarium nicht möglich. Hier hat sich die genetische Analyse als wichtiges neues Verfahren etabliert. Dies gilt z.B. für die Diagnose von Infektionskrankheiten wie HIV und HBV, genetische Prädisposition für bestimmte Krebsarten oder andere Erkrankungen, Forensik und eine Vielzahl weiterer Anwendungsgebiete. In enger Verzahnung von Grundlagenforschung und klinischer Forschung konnten die molekularen Ursachen und (pathologischen) Zusammenhänge einiger Krankheitsbilder bis auf die Ebene der genetischen Information zurückverfolgt und aufgeklärt werden. Diese wissenschaftliche Vorgehensweise steht jedoch noch am Anfang ihrer Entwicklung und gerade für ihre Umsetzung im Rahmen von Therapiestrategien bedarf es stark intensiver Anstrengungen. Insgesamt haben die Genomwissenschaften und die damit im Zusammenhang stehende

Nukleinsäureanalytik sowohl zum Verständnis der molekularen Grundlagen des Lebens als auch zur Aufklärung sehr komplexer Krankheitsbilder und pathologischer Vorgänge wichtige Beiträge geleistet.

Derzeit sind die verwendeten Verfahren häufig noch durch eine Vielzahl manueller Arbeitsschritte geprägt und auch die automatisierten Verfahren haben nur eine Leistung mit einem Durchsatz im Bereich von 10^4 Basen pro Stunde. Dies ist sehr wenig im Vergleich mit beispielsweise dem menschlichen Genom, welches in jeder Zelle des Körpers vorkommt und insgesamt eine Länge von ca. 3,2 Mrd. Basenpaaren aufweist. Um eine solche Datenkette zu entschlüsseln bzw. aufzuschreiben, bräuchte man bei einem Durchsatz von 200 Basen pro Minute etwa 200 Jahre. Alle Lebewesen unterscheiden sich jedoch voneinander. Dies bedeutet, daß die individuelle DNA jedes Lebewesens einmalig ist, demzufolge auch individuell entschlüsselt werden müßte, um durch systematische Vergleiche Aussagen über die komplexen biologischen Zusammenhänge erarbeiten zu können. Hierzu wären Geräte mit einer Analyseleistung im Bereich von 10^8 Basen pro Stunde notwendig, mit Hilfe deren die ermittelten Daten so aufbereitet werden können, daß eine sinnvolle Steuerung mit dem Bediener des Gerätes möglich ist.

Ein Gerätesystem, welches diesen Anforderungen genügt, soll nachfolgend zusammen mit dem dazugehörige Verfahren beschrieben werden.

Es werden verschiedene Verfahren und Vorrichtungen für die Polymer-Analytik, also das Sequenzieren der Basenabfolge zum Beispiel in einer DNA- oder RNA-Molekülkette, verwendet, weiterentwickelt und automatisiert. Diese Verfahren lassen sich nach dem verwendeten Nachweisprinzip im wesentlichen wie folgt klassifizieren:

- Der Nachweis molekularer Eigenschaften erfolgt beispielsweise mit einem Massenspektrometer. Darüber hinaus gibt es zahlreiche chromatographische Verfahren wie Gas-Chromatographie, Dünnschicht-Chromatographie, etc.. Zu den elektrisch unterstützten Chromatographie-Verfahren zählen die Gel-Elektrophorese oder die Kapillar-Elektrophorese).
- Ein System zum Nachweis molekularer Interaktionen ohne Markierung des Analyten erfolgt beispielsweise durch Plasmonenresonanz.

- Bei der Interaktion von Analyten mit fester Phase, muß der Analyt in aller Regel vorher markiert werden (radioaktive Markierung, enzymatische Markierung)

Für die Ermittlung einer bisher noch nicht bekannten Basensequenz, welche als "de novo-Sequenzierung" oder "Neusequenzierung" bezeichnet werden soll, wird bevorzugt die Kapillar-Elektrophorese eingesetzt. Für diesen Zweck existieren inzwischen Automaten der Firma Perkin Elmer, die mit 96 parallelen Kapillaren arbeiten und dabei einen Durchsatz von 400 Basen pro Minute leisten.

Die auf der Interaktion von Analyten mit fester Phase basierenden Verfahren können noch weiter untergliedert werden in, wobei unterschieden wird nach den Detektionsverfahren, die optisch z.B. durch Absorption, Fluoreszenz oder Lumineszenz oder aber elektrisch erfolgen können.

Weiterhin findet eine Unterscheidung bei der Zuordnung des Analyten zu seinem Träger statt (SINGLE mit nur einem immobilisierten Interaktionspartner pro Träger oder ARRAY mit mehr als einem immobilisierten Interaktionspartner pro Träger).

Das Herstellungsverfahren gliedert sich auf in beispielsweise die Beschichtung von Beads oder Tubes, das Spotten fertig synthetisierter Oligonukleotide auf den Träger oder auch die Synthese von Oligonukleotiden direkt im Reaktionsträger.

Auch die Trägerarten selbst unterscheiden sich in ihren Materialien wie Glas oder Kunststoff und in ihren Formen wie Mikrostrukturen, planaren Chips, Mikrotiterplatten, Tubes oder Beads. Die Präsentation zur Detektion kann entweder seriell oder parallel erfolgen. Die optische Detektion geschieht entweder seriell im Scanner oder parallel mit einer CCD-Kamera.

2 Anwendungsgebiet

Das im folgenden beschriebene Verfahren und die Vorrichtung zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren dient verschiedenen Aufgaben:

Zielsetzung ist zum einen die "Neusequenzierung" (*de novo sequencing*) nicht bekannter Nukleinsäuresequenzen (DNA, cDNA, RNA) einschließlich der räumlichen Zuordnung, respektive Kartierung. Mit diesem Vorgehen ist es möglich, ein

individuelles Gen-Profil jedes Individuums und jeder Spezies zu erstellen, sei es durch Sequenzierung von Teilen des Genomes oder des ganzen Genomes.

Weiterhin wird die "Re-Sequenzierung" (*resequencing*) von Nukleinsäuresequenzen - also der Vergleich von bereits bekannten Sequenzen (repräsentiert in Form der Polymer-Sonden) mit unbekannten Sequenzen in der zu untersuchenden Probe. Die bekannten Sequenzen werden dazu gezielt und der Fragestellung entsprechend ausgewählt

Als drittes wichtiges Anwendungsgebiet können außerordentlich flexibel Expressionsmuster analysiert werden. Die entsprechenden Polymer-Sonden werden dazu in aller Regel anhand bekannter Sequenzen ausgewählt. Der Einsatz des Verfahrens zur Bestimmung der Genexpression kann auch im Kontext von Hochdurchsatz-Screening erfolgen.

Darüber hinaus sind mit unterschiedlichen natürlich vorkommenden und künstlichen Polymer-Sonden unterschiedliche Ansätze für Screening-Verfahren und den Aufbau und die Analyse von Substanzbibliotheken denkbar. Dies kann u.a. im Zusammenhang mit der Suche nach und der Charakterisierung von pharmakologisch aktiven Substanzen erfolgen.

Mit dem Verfahren und der Vorrichtung betreffend die vorliegende Erfindung soll ein flexible und kosteneffektive Analyse einer großen Zahl von Polymeren dadurch ermöglicht werden, daß eine Vielzahl von individuellen und spezifischen Polymer-Sonden in miniaturisiertem Format bereitgestellt werden und im Anschluß daran diese Sonden mit Analyten des Probenmaterials verglichen werden. Dadurch soll in Screening- und Analyse- Verfahren eine ausreichend große Meßdatenmenge erzeugt werden, mit Hilfe deren die Informationsfülle biologischer Systeme ganzheitlich zu bewältigen und auszuwerten ist.

Die Anwendungsfelder für das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung zur zyklischen integrierten Synthese und Analyse von Polymersequenzen sind breitgefächert und erstrecken sich prinzipiell auf alle Anwendungen der Polymer-Analyse wie Gas-Chromatographie, Dünnschicht-Chromatographie, Gel-Elektrophorese, Kapillar-Elektrophorese, Massenspektrometrie etc. Gleiches gilt prinzipiell für alle Anwendungen hochparalleler Festphasen-Analyse.

Weiterhin ergeben sich Anwendungen im Rahmen der Substanzentwicklung und des Testens von entsprechenden Substanzen u.a. in der pharmakologischen Forschung, sowie in der molekularen Diagnostik und im Zusammenhang mit DNA- und / oder RNA-Analyse. Einsatzmöglichkeiten bieten sich weiterhin für das Screening nach molekularen Interaktionen im Umfeld klinischer Immunologie und Proteinanalyse. Und sind generell auch in anderen Bereichen der Molekularbiologie und der Histologie denkbar.

3 Stand der Technik

Die Verfahren, die dem Stand der Technik entnommen werden können, sind im wesentlichen in zwei Gruppen einzuteilen:

Zum einen handelt es sich hierbei um Verfahren mit dem technischen Potential für eine "De novo-Sequenzierung", also für eine Gewinnung von neuer Information über bisher unbekanntes Material.

Demgegenüber stehen die Vergleichstests, die sich ausschließlich für das "Re-Sequenzieren" eignen, also für den Vergleich von unbekanntem Probenmaterial mit ausgewählten bekannten Sequenzen mit einer spezifischen bekannten oder vermuteten Funktionalität, um auf diese Weise aus dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein dieser Sequenzen Rückschlüsse auf den Zustand des Probenmaterials, bzw. auf den biologischen Organismus, welchem er entnommen wurde, ziehen zu können.

Für das "De novo-Sequenzieren" eignen sich von den etablierten Verfahren vor allem diejenigen, die nach molekularen Eigenschaften trennen. Für DNA-Sequenzierung wird meistens die Elektrophorese verwendet, bei der die Moleküle nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die am weitesten entwickelte Ausführung hiervon ist die Kapillarelektrophorese. Entsprechende Geräte-Ausführungen haben das höchste Leistungspotential.

Das derzeit leistungsfähigste Gerät ist der genannte Automat der Firma Perkin Elmer mit 96 parallelen Kapillaren und einem Durchsatz von 400 Basen pro Minute. Dies ist eine in Anbetracht der Größe der in der Natur vorkommenden Genome

ausgesprochen geringe Leistungsfähigkeit, die daher den raschen und flexiblen Zugang zu Genomen nicht leisten kann. Das Optimierungspotential der Elektrophorese-Techniken ist weitgehend ausgeschöpft.

Verfahren zur Analyse von DNA-Sequenzen auf Basis von Vergleichen kurzer

- 5 Sonden bekannter Sequenz mit unbekannten Analyten (unter Immobilisierung entweder der Sonde oder des Analyten) eignen sich nur sehr begrenzt für die "Neusequenzierung". Das eigentliche Potential der etablierten Technologien liegt im "Resequenzieren". Diese Limitierung bezüglich größerer Mengen unbekannter Nukleinsäuren, respektive deren Sequenzen, ist bislang systemimmanent: Die
- 10 Herstellungsverfahren erlauben entweder eine gewisse Flexibilität, aber damit nur eine geringe Informationsdichte pro Analyse, oder sie haben eine hohe Informationsdichte, werden aber in einem sehr aufwendigen, teuren und unflexiblen Verfahren erstellt, das damit nur wenige Varianten erlaubt. Keines der bekannten Verfahren kann die für eine effiziente Sequenzierung erforderliche Menge an
- 15 Information umsetzen.

Für "Neusequenzierung" im größeren Maßstabe, z.B. bei Sequenzierung des Humangenoms, sind die vorhandenen Verfahren daher ungeeignet.

Für die Untersuchung von DNA- oder RNA-Fragmenten oder anderen biologisch relevanten Polymeren in den oben beschriebenen Verfahren können die Proben auf

20 unterschiedliche Weise vorbereitet werden. Solche sogenannten Proben-vorbereitungsschritte können Amplifikation, Fragmentierung, Anhängen von Markern (Fluoreszenz Lumineszenz), Einführung von Isotopen, chemische Derivatisierung umfassen.

4 Gegenstand der Erfindung und damit gelöste Aufgabe

- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung, die eine aus der Patentanmeldung 198 39 254.0 bekannte Lichtemissions-Detektionseinrichtung mit einem Automaten zur Analyse hochdichter Polymer-Arrays so in einem Gerät vereinigt, daß damit das erfindungsgemäße Verfahren in Form einer zyklischen integrierten Synthese und Analyse von Polymeren durchführbar ist. Dementsprechend
- 30 stellt sich diese neue Vorrichtung als ein System zur zyklischen integrierten Synthese

und Analyse dar, welches kurz als ISA-System bezeichnet sein soll. Erst durch die dabei erfindungsgemäß unmittelbare Kopplung von Synthese und Analyse wird in einem zyklisch verlaufenden Verfahren eine gegenüber dem Stand der Technik deutlich verbesserte Hochdurchsatz-Analyse von Polymeren ermöglicht. Dabei
5 können diese zu analysierenden Polymere beispielsweise als Bruchstücke oder Fragmente einer größeren Molekülkette vorliegen.

Aufgrund der direkten logischen Verknüpfung zwischen den Ergebnissen der Analyse eines ersten Polymersonden-Arrays und der Synthese des darauffolgend zu erstellenden Polymersonden-Arrays läßt sich der Informationsgewinn aus einem
10 ersten aus Synthese und Analyse bestehenden Zyklus in einen nachfolgenden ebensolchen Zyklus übertragen. Auf diese Weise wird ein lernendes Analysesystem schrittweise entwickelt.

Die besagte zyklisch verlaufende Abfolge von Synthese, Sequenzvergleich, Analyse der Vergleichsergebnisse und wiederum erfolgreicher Synthese kann beliebig oft
15 wiederholt werden. Somit kann ein beliebiges Abbruchkriterium gewählt werden.

5 Technische Lösung der Aufgabe

In einem Trägerkörper werden Reaktionsbereiche durch Mikrokanäle (Kapillaren) aus Behältern über Leitungen, Ventile und Fittings mit einem oder mehreren Fluiden befüllt. Bei derartigen Reaktionsbereichen handelt es sich nicht lediglich um Fluidkammern, es werden davon vielmehr alle Arten von abgrenzbaren Bereichen innerhalb einer Fluidik umfaßt.

Mit Hilfe einer programmierbaren Lichtquellenmatrix, wie sie bereits in der Patentanmeldung 199 07 080.6 zum "Verfahren zur Herstellung eines mit biologisch oder chemisch funktionellen Materialien beschichteten Trägers" beschrieben wurde,
25 werden dann ausgewählte Reaktionsbereiche dieses Reaktionsträgers belichtet und auf diese Weise die individuelle Synthese der Polymersonden gesteuert, wobei der Reaktionsträger in diesem Zusammenhang einen fluidischen Mikroprozessor darstellt.

Anstelle einer Belichtung der ausgewählten Reaktionsbereiche ist es in einer weiteren Ausführungsvariante vorgesehen, diese fluidisch individuell zu aktivieren, wodurch wiederum spezifische Polymersonden erzeugt werden.

Es folgt ein Vorgang, während welchem die Reaktionsbereiche gespült und neu gefüllt werden, um diese erneut zu aktivieren.

Sobald die so erfolgte Synthese abgeschlossen ist, werden die Reaktionsbereiche wieder gereinigt und ihnen entsprechend aufbereitetes Probenmaterial zugeführt. Derartiges Probenmaterial besteht beispielsweise aus Fragmenten genetischen Materials (DNA, RNA oder deren chemische Analoga), das aus ganzen Genomen, Fragmenten davon, Chromosomen, cDNA, Plasmide u.a. gewonnen werden kann. In einer Ausführung/Anwendung kann das Probenmaterial aus dem menschlichen Genom stammen. Bei der Probenvorbereitung kann das Probenmaterial mit entsprechenden Markern versehen werden, beispielsweise mit Fluoreszenz- oder Lumineszenzmarkern. Sobald das auf diese Weise markierte Fragment einen Bereich aufweist, der mit einer Polymersonde eines Reaktionsbereichs übereinstimmt, lagert sich dieses Fragment an die Sonde an.

Im Anschluß erfolgt abermals eine Spülung, wobei die nicht angelagerten Fragmente aus den Reaktionsbereichen herausgespült werden. Die dort verbleibenden Fragmente werden zum Beispiel anhand ihrer Marker optisch detektiert. Aufgrund der bekannten SONDENSEQUENZ ist damit auch die Sequenz der angelagerten dazu komplementären Fragmentsequenz (DNA oder RNA) bekannt.

Aus diesem Zusammenhang ergibt sich, daß der Reaktionsträger weit mehr als seine Funktion im herkömmlichen Sinne erfüllt, sondern darüber hinaus einen fluidischen Mikroprozessor darstellt.

Basierend auf dieser Information wird nach einer Entfernung der Sonden aus dem Trägerkörper oder nach einem Auswechseln des Trägerkörpers die nächste Belegung des Trägerkörpers mit individuellen Sonden für jeden Reaktionsbereich festgelegt.

In diesem zyklisch arbeitenden System stellt die Synthese der Polymersonden innerhalb der Reaktionsbereiche nur einen zeitlich begrenzten Verfahrensschritt dar.

Durch die unmittelbar daran anknüpfende Analyse werden die Sonden mit dem

geeignet vorbereiteten Probenmaterial verglichen. Das daraus resultierende Vergleichsergebnis wird vorzugsweise elektronisch abgespeichert.

Daraufhin wird der Reaktionsträger entweder dergestalt neutralisiert, daß die Reaktionsbereiche in chemisch und physikalisch identischen Zustand versetzt werden, oder aber es wird der Reaktionsträger gegen einen neutralen Reaktionsträger ausgewechselt, der wiederum entsprechenden Aktivierungs- und Synthese-Vorgängen unterworfen sein kann.

Alle beschriebenen Prozesse können permanent überwacht werden und auf diese Weise unter integrierter Qualitätskontrolle vollautomatisch ablaufen.

Die aus der Analyse gewonnene elektronisch gespeicherte Information steht jederzeit während der nachfolgenden Zyklen zur Verfügung, also entweder für den direkt nachfolgenden Schritt, oder aber auch erst zu einem späteren Zeitpunkt oder an einem anderen Ort. Damit ist ein Datenabruf aus einer Datenbank beispielsweise via Internet möglich, der es gestattet, einen neutralen Reaktionsträger entsprechend einer festzulegenden Anwendung so mit Polymersonden zu synthetisieren, daß er die für die Anwendung relevante Information enthält, die somit nicht selbst vor Ort oder in einem anderen gleichartigen Gerät vorliegen muß oder generiert werden muß. Mit Hilfe dieses Systems ist also ein Weg gefunden, die Information nur für minimale Zeit in Chemie umzuwandeln und nach Erhalt weiterer Information anschließend direkt wieder in elektronisch speicherbare Information zu übertragen. Damit ist der chemische Prozeß, dem allein die Information zu entnehmen ist, auf eine minimale Dauer zurückgeführt.

6 Verbesserungen der Erfindung gegenüber dem Stand der Technik

Durch die Rückkopplung und den damit ermöglichten Lernprozeß von Zyklus zu Zyklus ist das erfindungsgemäße Verfahren und die Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens für die Erforschung auch sehr großer und komplexer Molekülketten geeignet. Dies kann zum Beispiel beim Sequenzieren individueller Genome wie zum Beispiel dem menschlichen Genom erfolgen. Der Zeitaufwand verbessert sich dabei gegenüber dem Stand der Technik mindestens um das Hundertfache.

Weiterhin erlaubt es die beschriebene "Re-Sequenzierung" dem Anwender, individuelle Sonden vor Ort in der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit Hilfe lediglich eines neutralen Reaktionsträgers zu erzeugen und anschließend sofort mit der zu untersuchenden Probe zu vergleichen. Durch diese Möglichkeit entsteht eine maximale Variantenvielfalt der Sonden bei minimalem Platzbedarf.

Durch Kombination der "De novo-Sequenzierung" und der "Re-Sequenzierung" können diagnostische Tests oder Medikamente kurzfristig an ein Individuum angepaßt werden.

Die Notwendigkeit, fertige und komplexe Polymersonden-Matrizen zu lagern, entfällt vollständig. Darüberhinaus gibt es keine physikalische Beschränkung der Sondenanzahl oder der Sondenauswahl. Die benötigte Anzahl von Sonden kann über mehrere Reaktionsträger bzw. mehrere Zyklen in einem Reaktionsträger verteilt werden, da die einzelnen Sonden für die logische Auswertung der Vergleichsergebnisse keinen Ortsvorgaben unterliegen.

Trotz der komplexen Datenauswertung bedarf es nur eines Minimums an unterschiedlichen Hardwarekomponenten, da die Trägerkörper, die entweder pro Zyklus oder auch nur bei Verschleiß gewechselt werden müssen, zunächst alle identisch sind. Ihre Individualität ergibt sich erst aus der spezifischen Polymersonden-Synthese und aus der schrittweise durch die Analysen gewonnenen Information und sie wird direkt nach dem Synthese- und Analyse-Verfahren wieder in reine Information überführt, so daß dann die Individualität, also die kennzeichnenden Merkmale der biologischen/chemischen Materie wiederum nur noch in Form elektronischer Daten vorliegt.

7 Ausführungsbeispiele

In Figur 1 ist eine erfindungsgemäße Vorrichtung mit einem auswechselbaren Reaktionsträger 40 dargestellt, wobei der prinzipielle Aufbau unabhängig davon ist, ob der Reaktionsträger in jedem Zyklus oder erst bei Verschleiß ausgetauscht wird. In letzterem Fall findet eine Reinigung und anschließende Wiederverwendung derselben Kapillaren statt. Dargestellt ist eine programmierbare Lichtquellenmatrix 30. Deren Programmierbarkeit kann in die Systemkomponente 20, die aus einem

Rechner bzw. einem Computer besteht, integriert sein, so daß nur eine frei ansteuerbare Lichtquellenmatrix als Komponente 30 notwendig ist. Diese Lichtquellenmatrix 30 strahlt Licht definierter Wellenlänge und Intensität auf beliebig ansteuerbare Orte einer zumindest zweidimensionalen Matrix, die der hochparallelen

5 Belichtung der Reaktionsbereiche im Reaktionsträger 40 dient. Besagter Reaktionsträger 40 wird durch die Lichtquellenmatrix 30 mit dem rechnergesteuerten Lichtmuster bestehend aus Energiewellen in allen Reaktionsbereichen individuell bestrahlt. Über das fluidische Anschlußsystem 64 werden die vom Fluidikmodul 60 bereitgestellten Fluide in den Reaktionsträger 40 transportiert und in dessen in der
10 Zeichnung nicht dargestellten Mikrostruktur in geeigneter Weise an die Reaktionsbereiche weitergeleitet. Dadurch wird der Reaktionsträger 40 zu einem fluidischen Mikroprozessor. Dieser kann entweder nach jeder Anwendung gewechselt werden oder nach jeder Anwendung gereinigt und nur zu Servicezwecken bei Verschleiß gewechselt werden.

15 Das eintretende Licht kann zum Beispiel für Absorptionsmessungen, die Aktivierung von Photoreaktionen oder das Anregen von Fluoreszenz genutzt werden.

Das aus dem Reaktionsträger 40, bzw. dem fluidischen Mikroprozessor austretende Licht kann beispielsweise das im Durchlicht den Reaktionsträger passierende Licht der Lichtquellenmatrix 30 sein. Es kann sich dabei jedoch auch um Lichtsignale
20 handeln, die in den einzelnen Reaktionsbereichen des Reaktionsträgers 40 durch beispielsweise Fluoreszenz oder Lumineszenz erzeugt werden.

Die Detektormatrix 50, die zum Beispiel aus einem CCD-Chip mit oder ohne Optik besteht, ist so gegenüber einer Lichtquellenmatrix 30 mit einem dazwischen liegenden Reaktionsträger 40 angeordnet, daß dadurch eine dreifache
25 Matrixanordnung aus Licht-, Reaktionsträger- und Detektormatrix entsteht.

Das Fluidmodul 60 dient der Versorgung des Reaktionsträgers 40 zum Beispiel mit Einsatzstoffen, Schutzgasen, Chemikalien, wie Lösemitteln, etc. und Probenmaterial. Das Fluidmodul 60 besteht aus Tanks 61, die durch Pumpen 62 und Ventile 63 in geeigneter Weise entleert werden. Die Tanks können einzeln oder im Cluster
30 ausgewechselt oder neu gefüllt werden. Permanent benötigte Fluide, wie beispielsweise Schutzgas, können auch wie Leitungen kontinuierlich (ohne Tanks im

System) zugeführt werden. Der fluidische Abfall der verschiedenen Verfahren kann entweder im Reaktionsträger 40 in integrierten Tanks oder in einem Abfallsystem 65 oder bei Clustern außerhalb des einzelnen Systems aufgefangen wird.

Ebenfalls dargestellt ist die Systemgrenze 10 der Vorrichtung, die als Einzelgerät oder auch in zentralen oder dezentralen Clustern eingesetzt werden können. Diese Cluster sind immer informationstechnisch miteinander verknüpft. Die an einem Ort befindlichen Systeme können auch gemeinsam durch manuelle Bedienung oder automatisierte Komponenten mit Energie, Fluiden, wie Einsatzstoffen, Reaktionschemikalien, Schutzgasen und Probenmaterial, sowie mit den benötigten Reaktionsträgern versorgt werden.

Die Systemkomponente 20 in Form eines Computers oder Rechners übernimmt die Steuerung bzw. Regelung des Systems. Hierunter fallen auf der Basis der Berechnung der Sondensequenzen für die einzelnen Reaktionsbereiche die Steuerung der Lichtquellenmatrix 30 sowie der Fluidkomponente 60. Ferner werden die Daten der Detektormatrix 50 erfaßt und ausgewertet.

Jede Vorrichtung kann somit über seine Systemgrenze 10 hinweg mit anderen Vorrichtungen oder Systemen, bestehend aus wiederum einer erfindungsgemäßen Vorrichtung oder anderen Rechnern oder Datenbanken, kommunizieren. Dies kann beispielsweise über Leitungen, Bussysteme oder über das Internet erfolgen. Dabei kann die Kommunikation zentral koordiniert über Leitrechner erfolgen oder als Cluster gleichberechtigter Systeme.

Ebenfalls vorgesehen ist eine Datenschnittstelle 21 zur Systemumgebung.

Figur 2 zeigt den Aufbau aus Figur 1 für eine fluidische Individualisierung der Reaktionsbereiche. Wiederum dargestellt ist ein Reaktionsträger 41. Dieser wird durch das fluidische Entschützungsmodul 32 rechnergesteuert individuell benetzt. Über das fluidische Anschlußsystem 64 werden die vom Fluidmodul 60 bereitgestellten Fluide in den Reaktionsträger transportiert und in dessen in der Zeichnung nicht dargestellten Mikrostruktur in geeigneter Weise an die Reaktionsbereiche weitergeleitet. Dadurch wird der Reaktionsträger 40 zu einem fluidischen Mikroprozessor. Dieser kann entweder nach jeder Anwendung gewechselt

werden oder nach jeder Anwendung gereinigt und nur zu Servicezwecken bei Verschleiß gewechselt werden.

In diesen Reaktionsträger kann zum Beispiel von der Seite Licht für die Anregung von Fluoreszenzreaktionen etc. eingespeist werden.

- 5 Das aus dem Reaktionsträger, bzw. dem fluidischen Mikroprozessor austretende Licht kann beispielsweise durch Lumineszenz an den Reaktionsbereichen erzeugt werden.

Das fluidische Entschützungsmodul 32 kann jeden Reaktionsbereich auf dem Reaktionsträger 40 mit mindestens einer der Benetzungskomponenten 33 (z.B. Düsen, Kapillaren, etc.) individuell mit Fluiden in Kontakt bringen. Hierdurch können zum Beispiel lokal chemische und biochemische Reaktionen aktiviert werden

Das Fluidmodul 31 dient der Versorgung des fluidischen Entschützungsmoduls 32 mit Einsatzstoffen oder Chemikalien. Das Fluidmodul 31 ist dem Modul 60 vergleichbar aufgebaut und besteht je nach Bedarf aus Tanks, Leitungen, Ventilen, etc..

- 15 Die Detektormatrix 50, die zum Beispiel aus einem CCD-Chip mit oder ohne Optik besteht, ist so gegenüber einem fluidischen Entschützungsmodul 32 mit einem dazwischen liegenden Reaktionsträger 41 angeordnet, daß dadurch wiederum eine dreifache Matrixanordnung entsteht.

Das Fluidmodul 60 dient der Versorgung des Reaktionsträgers 40 zum Beispiel mit Einsatzstoffen, Schutzgasen, Chemikalien, wie Lösemitteln, etc. und Probenmaterial.

- 20 Das Fluidmodul 60 besteht aus Tanks 61, die durch Pumpen 62 und Ventile 63 in geeigneter Weise entleert werden. Die Tanks können einzeln oder im Cluster ausgetauscht oder neu gefüllt werden. Permanent benötigte Fluide, wie beispielsweise Schutzgas, können auch wie Leitungen kontinuierlich (ohne Tanks im System) zugeführt werden. Der fluidische Abfall der verschiedenen Verfahren kann
25 entweder im Reaktionsträger 40 in integrierten Tanks oder in einem Abfallsystem 65 oder bei Clustern außerhalb des einzelnen Systems aufgefangen wird.

- Wiederum dargestellt ist die bereits erläuterte Systemgrenze 10 der Vorrichtung und die Systemkomponente 20 in Form eines Computers oder Rechners, der die Steuerung bzw. Regelung des Systems übernimmt. Hierunter fallen auf der Basis der
30 Berechnung der Sondensequenzen für die einzelnen Reaktionsbereiche die

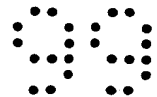
Steuerung der Fluidmodule 31 und 60, sowie des fluidischen Entschützungsmoduls 32. Ferner werden die Daten der Detektormatrix 50 erfaßt und ausgewertet.

Jede Vorrichtung kann somit über seine Systemgrenze 10 hinweg mit anderen Vorrichtungen oder Systemen , bestehend aus wiederum einer erfindungsgemäßen
5 Vorrichtung oder anderen Rechnern oder Datenbanken, kommunizieren. Dies kann beispielsweise über Leitungen, Bussysteme oder über das Internet erfolgen. Dabei kann die Kommunikation zentral koordiniert über Leitrechner erfolgen oder als Cluster gleichberechtigter Systeme.

Ebenfalls vorgesehen ist eine Datenschnittstelle 21 zur Systemumgebung.

Patentansprüche

- 1 Verfahren zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren, dadurch gekennzeichnet, daß in physikalisch und chemisch identischen Reaktionsbereichen eines Reaktionsträgers durch Ankopplung von Monomeren oder Polymeren in einem oder mehreren Synthesevorgängen individuelle Polymersondenmuster erzeugt werden, wobei jeder Reaktionsbereich individuell durch eine homogene Population von Polymersonden spezifiziert wird, und daß direkt nach diesem Synthesevorgang in geeigneter Weise aufbereitetes Probenmaterial in die Reaktionsbereiche eingebracht und in einem Analysevorgang mit besagten Polymersonden verglichen wird.
- 2 Verfahren zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Syntheseprozess oder Analyseprozess oder sowohl Synthese- als auch Analyseprozess in einer beliebigen Anzahl der Reaktionsbereiche des Reaktionsträgers überwacht und geregelt wird.
- 3 Verfahren zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß nach Abschluß von Synthese- und Analyseprozess der Reaktionsträger gegen einen neuen Reaktionsträger mit physikalisch und chemisch identischen Reaktionsbereichen ausgetauscht wird.
- 4 Verfahren zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß nach Abschluß von Synthese- und Analyseprozess die Reaktionsbereiche des Reaktionsträger wieder in einem chemisch und physikalisch identischen Zustand versetzt werden.
- 5 Verfahren zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der physikalisch und chemisch identische Zustand durch Reinigung oder Reinigung und anschließende Neubeschichtung erreicht wird.



18

- 6 Verfahren zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymersondenmuster durch eine Computerprogrammierung festgelegt wird.
- 5 7 Verfahren zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Individualisierung der einzelnen Reaktionsbereiche durch einen lichtgesteuerten chemischen Prozeß erfolgt, wobei der Lichteintrag in die Reaktionsbereiche über eine programmierbare Lichtquellenmatrix erfolgt.
- 8 Verfahren zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Individualisierung der einzelnen Reaktionsbereiche durch Benetzung der einzelnen Reaktionsbereiche mit einem den Reaktionsbereich aktivierenden Fluid erfolgt, wobei die Auswahl der zu aktivierenden Reaktionsbereiche steuerbar erfolgt.
- 15 9 Verfahren zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die aus der einer Synthese folgenden Analyse gewonnenen Daten zur Bestimmung des aufgabenspezifischen Polymersondenmusters der darauffolgenden Synthese verwendet werden.
- 20 10 Verfahren zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Zyklus aus Synthese und Analyse bis zu einem vorgegebenen Abbruchkriterium beliebig oft wiederholt wird und dabei jede nachfolgende Synthese ein unmittelbares Analyseergebnis liefert, welches bei der Bestimmung des aufgabenspezifischen Polymersondenmusters einer nachfolgenden Synthese herangezogen werden kann.
- 25 11 Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, daß sie aus einer programmierbaren Lichtquellenmatrix, einer Detektormatrix, einem zwischen programmierbarer Lichtquellenmatrix und Detektormatrix angeordneten

Reaktionsträger, einem fluidischen Anschlußsystem und einem Fluidmodul zur Versorgung des Reaktionsträgers besteht.

5 12 Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zur integrierten Synthese und Analyse von Polymeren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, daß sie aus einem fluidischen Entschützungsmodul, einem Fluidmodul für die Versorgung des fluidischen Entschützungsmoduls, einer Detektormatrix, einem zwischen fluidischen Entschützungsmodul und Detektormatrix angeordneten Reaktionsträger, einem fluidischen Anschlußsystem und einem Fluidmodul zur Versorgung des Reaktionsträgers besteht.

13 Vorrichtung nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Regelung der Systemkomponenten computergesteuert erfolgt.

15 14 Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in einem Zyklus eine Anzahl n von Reaktionsbereichen auf bis zu n Reaktionsträger verteilt sein kann, wobei diese 1 bis n Reaktionsträger in 1-n Vorrichtungen gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13 abgearbeitet werden können, die informationstechnisch miteinander verknüpft, jedoch voneinander ortsunabhängig sind.

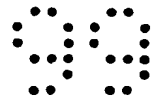
15 Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13 zur Neusequenzierung oder Resequenzierung von komplexem genetischen Material.

16 Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13 zur kombinierten Neu- und Resequenzierung von komplexem genetischen Material.

17 Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13 zur Neusequenzierung oder Resequenzierung individueller Genome.

25 18 Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13 zur kombinierten Neu- und Resequenzierung individueller Genome.

19 Verwendung der Vorrichtung nach Anspruch 11 zur Neusequenzierung oder Resequenzierung synthetischen komplexen genetischen Materials.



- 20 Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13 zur kombinierten Neu- und Resequenzierung synthetischen komplexen Materials.
- 21 Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13 zur Neusequenzierung oder Resequenzierung individueller Analyten.
- 5 22 Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 bis 13 zur kombinierten Neu- und Resequenzierung individueller Analyten.
- 23 Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 22 zur Ermittlung der individuellen und patientenspezifischen Wirkung von Pharmaka.
- 24 Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 22 zur Erlangung diagnostischer Information für die individuelle Patientenversorgung.
- 25 Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 22 zur Wirkmusteranalyse pharmakologischer Substanzen.
- 26 Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 22 zur Erstellung von Substanzbibliotheken.
- 15 27 Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 22 zum Vergleich der Individuen einer Population.

Mar. 10, 1999

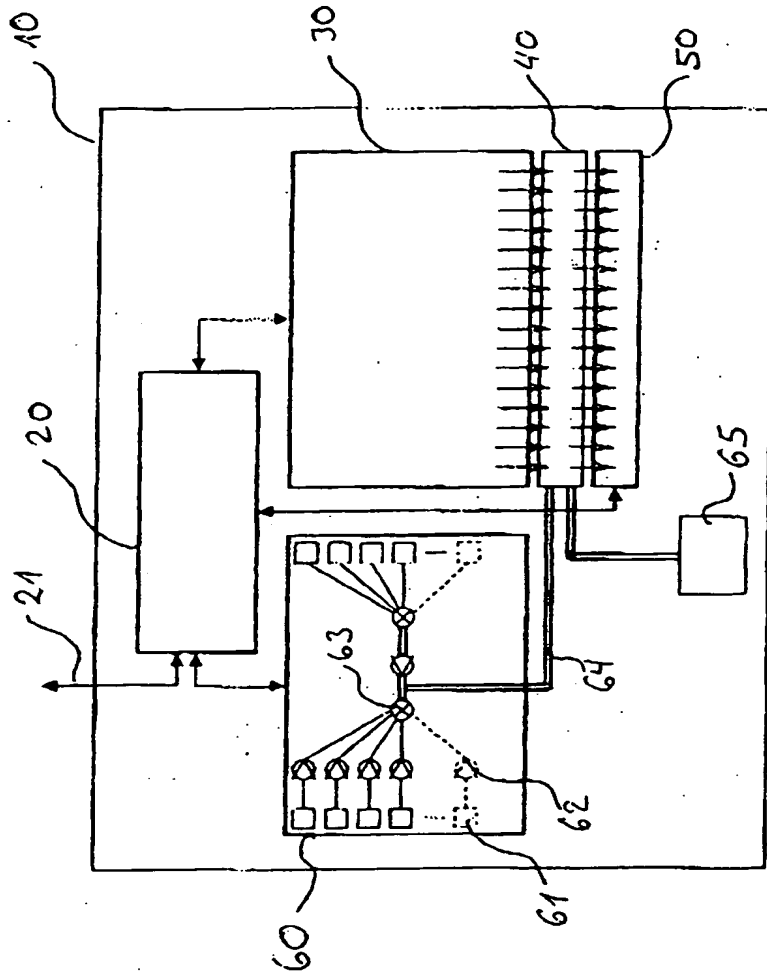
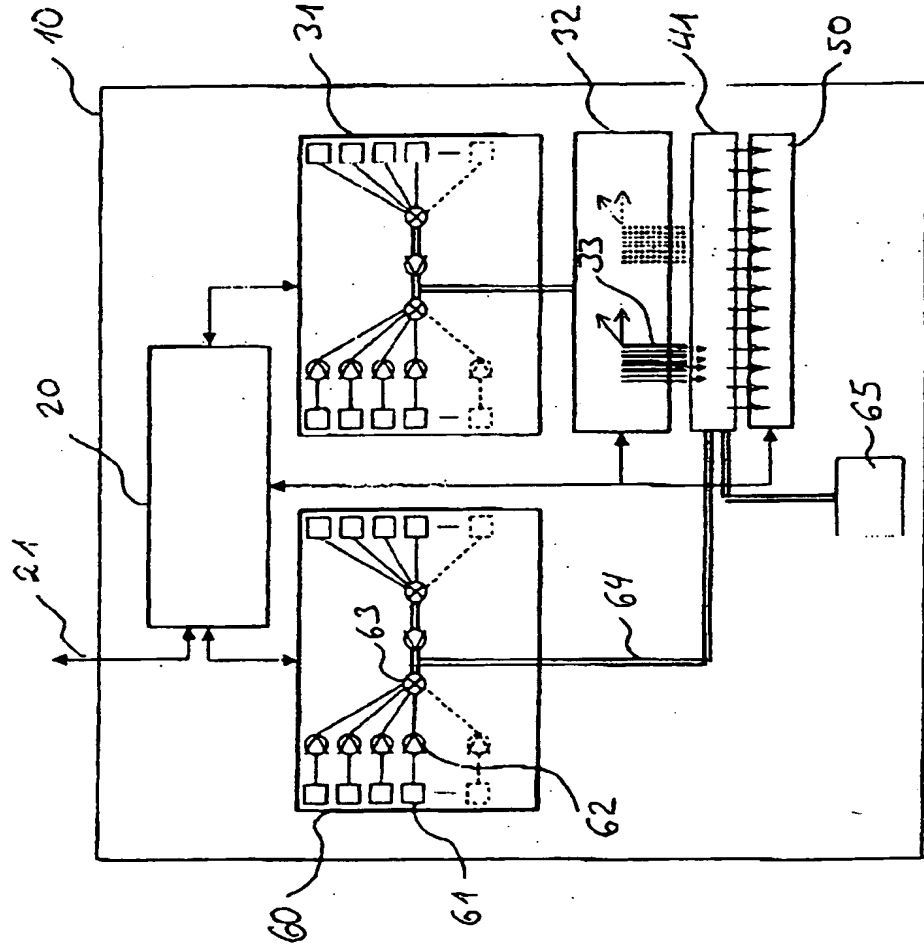


Fig. 1

Mar 10 1999

13

Fig. 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)